

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-264284

(P2001-264284A)

(43)公開日 平成13年9月26日(2001.9.26)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-ト*(参考)
G 0 1 N 27/327		C 1 2 M 1/34	E 2 G 0 4 5
C 1 2 M 1/34		C 1 2 N 11/06	4 B 0 2 9
C 1 2 N 11/06		C 1 2 Q 1/00	B 4 B 0 3 3
C 1 2 Q 1/00		G 0 1 N 33/483	F 4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/483		27/30	3 5 3 J
審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 4 頁)			

(21)出願番号 特願2000-71732(P2000-71732)

(22)出願日 平成12年3月15日(2000.3.15)

(出願人による申告) 国等の委託研究成果に係る特許出願 (平成11年度新エネルギー・産業技術総合開発機構 (超高感度マイクロ集積化分析システムの開発) 再委託研究、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受けるもの)

(71)出願人 592031097

松下寿電子工業株式会社

香川県高松市古新町8番地の1

(71)出願人 598165910

三澤 弘明

徳島県徳島市大谷町大開40-39

(72)発明者 上甲 茂樹

香川県高松市古新町8番地の1 松下寿電子工業株式会社内

(74)代理人 100097445

弁理士 岩橋 文雄 (外2名)

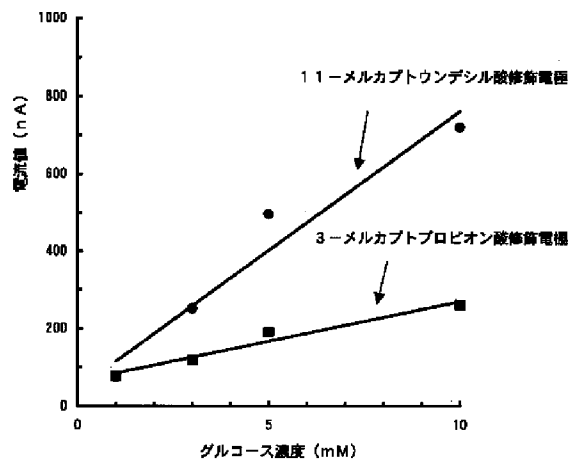
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 バイオセンサ

(57)【要約】

【課題】 電極の修飾、酵素の架橋を目的通りに実現でき、高い応答性能を有するバイオセンサを提供する。

【解決手段】 長いアルキル鎖とカルボキシル基を有するアルカンチオールを電極の修飾物質及び酵素の架橋物質として用い、アルカンチオールのアルキル鎖により誘起される配向性の高いことが高性能のバイオセンサを実現可能とする。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 電極表面を修飾するアルカンチオール分子が、電極表面上で、van der Waals力などの分子間相互作用を誘起することで、アルカンチオールの電極表面上での配向性を保持し、このことがバイオセンサの応答性能を向上させることを特徴とするバイオセンサ。

【請求項2】 電極を修飾するアルカンチオールに架橋結合する酵素が、被検体物質について特異的な酸化還元能を有し、酵素の酸化還元生成物を電極により検出することを特徴とする請求項1に記載のバイオセンサ。

【請求項3】 アルカンチオール分子内にカルボキシル基などの官能基を有し、この官能基と酵素を架橋剤により架橋結合することで、電極表面に酵素を固定化することを特徴とする請求項1または請求項2に記載のバイオセンサ。

【請求項4】 金、白金などの貴金属を電極とし、その電極表面をアルカンチオールにより修飾した電極を利用することを特徴とする請求項1、請求項2または請求項3に記載のバイオセンサ。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、バイオセンサの構築方法に関するもの、特に酵素を固定化する電極の修飾物質であるアルカンチオール分子間に相互作用が存在する場合にバイオセンサ性能が向上する特徴を有するものである。

## 【0002】

【従来の技術】従来のバイオセンサにおいて酵素を固定化する場合、初期にはポリアクリルアミドなどのゲルのマトリックス中に酵素を包括し、電極表面上でゲルを硬化させて固定化していた（例えば、Nature 214巻、986～988頁、1971年）。しかしながらこの方法では、包括した酵素がゲルマトリックス中から漏洩しやすく、固定化が不十分であった。

【0003】次に酵素を牛血清アルブミンと混合し、グルタルアルデヒドにより両者を架橋重合し、電極表面上に固定化する方法が考案された（例えば、Appl. Biochem. Biotechnol. 9巻 95～104頁 1984年）。しかしながらこの方法では、酵素により至適架橋重合条件を十分に検討する必要があり、酵素を失活させる場合もあり、簡便に適用するには不十分であった。

【0004】上記のように酵素を共役重合物に包括し、それを電極表面に点着あるいは浸漬して固定化するのではなく、直接電極表面に固定化する方法も考案されている。

【0005】グラファイト電極をプラズマ酸化処理することにより電極表面にカルボキシル基を形成させ、水溶性カルボジイミドあるいはグルタルアルデヒドにより酵

素を電極表面に直接固定化し、バイオセンサを構築することが報告されている（例えば、J. Am. Chem. Soc. 102巻 4231～4235頁 1980年）。

【0006】しかしながらこの方法では酵素を固定化する電極がグラファイト等の炭素系電極に限られ、電極応答性のよい貴金属電極には適用しにくい。

【0007】この問題を解決するために、貴金属電極に直接酵素を固定化するため、電極を予めシラン処理あるいはアリルアミン処理した後、グルタルアルデヒドで酵素を架橋結合する方法が考案されている（例えば、Anal. Chem. 52巻、1198～1205頁、1980年あるいは、Biochemistry 23巻、2203～2210頁 1984年）。

【0008】しかしながらこれらの方法は、操作が煩雑であり、グルタルアルデヒドを架橋剤として用いるため、電極を修飾したシラン間あるいはアリルアミン間で架橋結合することにより、酵素が電極に固定化できない部位が生じたり、酵素内及び酵素間での架橋結合が生じることで酵素の失活をまねく可能性がある。

## 【0009】

【発明が解決しようとする課題】この様に電極を固定化するために様々な方法が考案されているが、一長一短があり、電極修飾物と酵素とを目的通り規則的に酵素を固定化することが困難であった。

## 【0010】

【課題を解決するための手段】前記課題を解決するために、本発明のバイオセンサは、近年見出された貴金属とチオール分子とが自発的に結合する現象を利用し（例えば、J. Am. Chem. Soc. 105巻、4481頁 1983年）、貴金属電極を修飾し、さらにチオール分子にカルボキシル基を付加させることにより、これと酵素とを架橋結合させ、容易に目的通りに酵素を電極表面に固定化できるバイオセンサを構築することを特徴としたものである。

【0011】本発明によれば、貴金属電極をチオールカルボン酸分子で修飾し、さらに酵素をこの分子のカルボキシル基と架橋結合するため修飾物質間の架橋反応、酵素の分子間及び分子内架橋反応を防止し、さらにチオールカルボン酸にアルキル基を導入する（いわゆるアルカンチオール）ことで電極を修飾したチオール分子に分子間相互作用が生じ、チオール分子が電極表面で規則的に配列するようになり、このことから電極表面での酵素分子の規則的な配位を可能とし、応答特性の良好なバイオセンサを提供できる。

## 【0012】

【発明の実施の形態】本発明の請求項1に記載のバイオセンサ及びその製造方法は、電極表面を修飾するアルカンチオール分子が、電極表面上で、van der Waals力などの分子間相互作用を誘起することで、ア

ルカンチオール電極表面上での配向性を保持し、このことがバイオセンサの応答性能を向上させることを特徴とするバイオセンサであり、電極を直接修飾する分子間に相互作用を誘起することが、修飾物質の配向性を生み、さらに固定化する酵素の配列規則性を生むことが、バイオセンサの高感度化を実現するものである。

【0013】本発明の請求項2に記載のバイオセンサ及びその製造方法は、電極を修飾するアルカンチオールに架橋結合する酵素が、被検体物質について特異的な酸化還元能を有し、酵素の酸化還元生成物を電極により検出することを特徴とする請求項1に記載のバイオセンサであり、酵素により生じた酸化還元生成物を電極上で捕捉し、電気的な酸化還元により生じる電流を検出することで、被検体物質を検出可能とするバイオセンサを実現するものである。

【0014】本発明の請求項3に記載のバイオセンサ及びその製造方法は、アルカンチオール分子内にカルボキシル基などの官能基を有し、この官能基と酵素を架橋剤により架橋結合することで、電極表面に酵素を固定化することを特徴とする請求項1及び請求項2に記載のバイオセンサであり、固相である電極に修飾物質及び被固定化物質を順次積層する形態でバイオセンサを構築するため、修飾物質及び被固定化物質の分子間あるいは分子内架橋結合を防止し、目的通りに酵素を固定化したバイオセンサを実現するものである。

【0015】本発明の請求項4に記載のバイオセンサ及びその製造方法は、金、白金などの貴金属を電極とし、その電極表面をアルカンチオールにより修飾した電極を利用することを特徴とする請求項1、請求項2及び請求項3に記載のバイオセンサであり、導電性のよい貴金属電極を簡便に修飾すること利用し、この分子に酵素を固定化することで、応答性の良好なバイオセンサを実現するものである。

【0016】(実施の形態1)以下に、本発明の請求項1、請求項2、請求項3及び請求項4に記載された発明の実施の形態について、図1、図2を用いて説明する。

【0017】図1は、電極に酵素を固定化する手順を模式的に示した図である。

【0018】電極として貴金属である金を用い、まずこの金電極を5ミリモル（以下、mMと略す）のメルカプトアルキルカルボン酸・25パーセントエタノール・50mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.0）中に30分間浸漬する（A～B）。次に10mM塩酸1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド・50mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.0）中に30分間電極を浸漬する（B～C）。次に10mMN-ヒドロキシルホフォコハク酸イミドナトリウム・50mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.0）中に30分間電極を浸漬する（C～D）。最後に予め50mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.0）で透析した酵素溶液中に電極

を浸漬する（D～E）。

【0019】以上の方法により貴金属電極に酵素を固定化することができる。

【0020】この方法は、固相である電極をアルカンチオール、酵素及び架橋剤溶液中に順次浸漬していくため、各浸漬工程での未反応・余剰物を次の浸漬の前に洗浄除去することができ、不要の反応を未然に防止することができる。

【0021】図2は、上記の方法により構築したバイオセンサの応答性能を示した図である。

【0022】電極として金電極（直径1.6ミリメートル、BAS社製）、メルカプトアルキルカルボン酸として11-メルカプトウンデシル酸及び3-メルカプトプロピオン酸、固定化する酵素としてグルコースオキシダーゼを用いた。グルコースオキシダーゼは100マイクロモルの溶液を透析して用いた。

【0023】構築したバイオセンサは、反応セル中にグルコースを滴下し、グルコースとグルコースオキシダーゼの反応により生成する過酸化水素を1分後に0.8ボルトの電圧を印加して、過酸化水素の分解により生じる電流値を測定した。

【0024】図2に示す通り、同じ酵素を固定化した電極でも11-メルカプトウンデシル酸で電極を修飾したセンサの方が約3倍感度の向上を示す。

【0025】感度の向上は、アルカンチオール分子のチオール基とカルボキシル基の間にあるアルキル基の炭素数が5から有意に良化し、炭素数15まで有意である。

【0026】このアルキル鎖長が長くなることによるセンサ応答の良化傾向は、アルキル鎖が長くなることにより誘起されるvan der Waals力などによりアルカンチオール分子間に相互作用が生まれ、アルカンチオール分子の電極表面での高配向性をもたらす。この高配向性の分子上にさらに酵素を固定化するため、酵素もより規則的な配列を保持しながら固定化するものと考えられる。

【0027】図2に示される通り、炭素数が10の11-メルカプトウンデシル酸は、電極表面で高い配向性を発現できるため、これに固定化したグルコースオキシダーゼにおいても高い規則性を保持する。このため被検体物質であるグルコースとグルコースオキシダーゼとの酵素反応により生じた過酸化水素が効率よく電極に伝達され、高い応答性能を実現することが可能となる。

【0028】なお、図2において本発明の一例として、グルコースオキシダーゼを固定化したバイオセンサについて示したが、これに限定することなく、ピラノースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、グルタミン酸オキシダーゼ、ザルコシンオキシダーゼ、ヒルビン酸オキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼなどについても適用可能である。

【0029】また、本発明において貴金属電極材料の一例として、金について示したが、これに限定することなく、白金、銅、銀、パラジウム、ニッケル、鉄、チタン、カドミウム、インジウム、ガリウムなどの単体あるいは合金においても適用可能である。

【0030】

【発明の効果】以上のように、本発明のバイオセンサ及びその製造方法によれば、電極の修飾物質さらには電極と酵素を結ぶ酵素の固定化物質としてアルキル鎖長の長いアルカンチオールを用いることで、酵素反応生成物の電極への伝達性を効率よくし、これにより応答性能の高いバイオセンサを提供することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施の形態1におけるバイオセンサ構

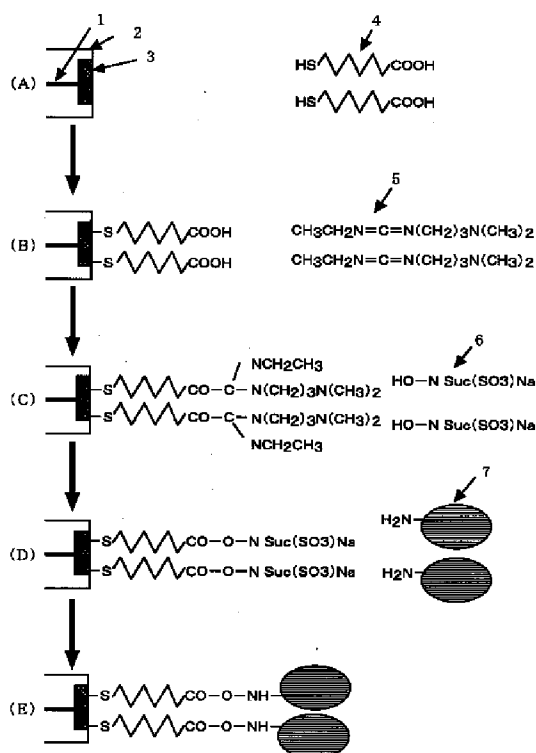
築方法の模式図

【図2】本発明の実施の形態1におけるアルキル鎖長の違うアルカンチオールにグルコースオキシダーゼを固定化したときの応答性の比較を示したグラフ

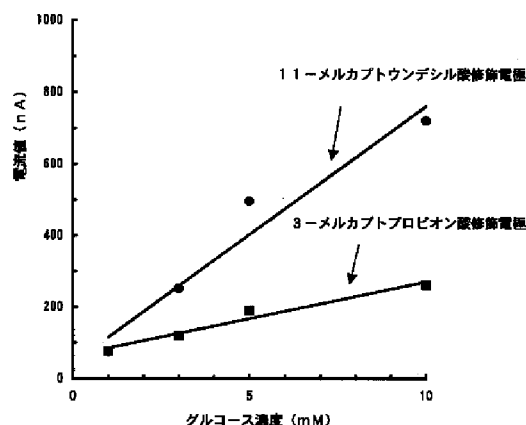
【符号の説明】

- 1 ワ이어
- 2 絶縁樹脂
- 3 貴金属電極
- 4 メルカプトアルキルカルボン酸
- 5 塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド
- 6 N-ヒドロキシスルホコハク酸イミドナトリウム
- 7 酵素

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 三澤 弘明  
徳島県徳島市八万町大坪232-1 大坪住  
宅1-31

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA80 DB21 DB30 FB01  
FB05 GC20  
4B029 AA07 BB16 CC05 CC08 FA12  
4B033 NA01 NA22 NB02 NB32 NB43  
NC02 NC05 ND05 ND16 NF04  
4B063 QA01 QQ21 QR01 QR84